



(19)

(11) Publication number:

09299079 A

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: 08120703

(51) Intl. Cl.: C12N 9/48 C07H 21/04 C12N 15/09

(22) Application date: 15.05.96

(30) Priority:

(43) Date of application publication: 25.11.97

(84) Designated contracting states:

(71) Applicant: JAPAN ENERGY CORP

(72) Inventor: MATSUMOTO MITSUHIRO
MISAWA SATORU
CHIBA SHINSUKE

(74) Representative:

(54) RECOMBINANT HERPES
SIMPLEX VIRUS 1-TYPE
PROTEASE AND ITS
PRODUCTION

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme significantly improved in reaction rate, consisting of a fused protein produced by binding a peptide chain containing herpes simplex virus 1-type protease region to glutathione-S- transferase's C-terminal.

SOLUTION: This enzyme is a new recombinant herpes simplex virus 1-type protease consisting of a fused protein produced by binding a peptide chain of the formula virtually containing herpes simplex virus 1-type protease region to the C-terminal of glutathione-S-transferase. This enzyme is significantly improved in reaction rate, being suitable for assessment appropriate for rapid screening of inhibitors to herpes simplex virus 1-type protease. This recombinant enzyme is obtained as follows: a DNA fragment of a nucleic acid base sequence coding the enzyme of the formula is transfected into a glutathione-S-transferase expression vector, which is, in turn, transduced into Escherichia coli to effect transformation, and the resultant transformant is cultured to express the relevant gene.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

```

Met Ala Ala Asp Ala Pro Gly Asp Arg Met Glu Glu Pro Leu Pro
  1              5              10              15
Asp Arg Ala Val Pro Ile Tyr Val Ala Gly Phe Leu Ala Leu Tyr
              20              25              30
Asp Ser Gly Asp Ser Gly Glu Leu Ala Leu Asp Pro Asp Thr Val
              35              40              45
|
|
|
|
|
|
|
His Thr Leu Leu Ser Thr Ala Val Asn Asn Met Met Leu Arg Asp
              225              230              235
Arg Trp Ser Leu Val Ala Glu Arg Arg Arg Gln Ala Gly Ile Ala
              240              245              250
Gly His Thr Tyr Leu Gln Ala
              255

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-299079

(43) 公開日 平成9年(1997)11月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/48			C 1 2 N 9/48	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// (C 1 2 N 9/48				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平8-120703

(22) 出願日 平成8年(1996)5月15日

(71) 出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー
東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 発明者 松本 光広

埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式
会社ジャパンエナジー内

(72) 発明者 三沢 悟

埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式
会社ジャパンエナジー内

(72) 発明者 知場 伸介

埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式
会社ジャパンエナジー内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 酵素の反応速度が著しく改善された組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ及びその製造方法の提供。

【解決手段】 配列番号: 1 に示されるペプチド鎖からなる単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結してなる融合蛋白質である組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ、並びに形質転換大腸菌 *E.coli* BL21 (DE3) / pLysS, pGSTThHP (FERM P-15610) の培養によるその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結してなる融合蛋白質である組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸配列で示されるペプチド鎖からなる単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結してなる融合蛋白質である請求項1記載の組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ。

【請求項3】 単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖をコードするDNA断片を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 の EcoR I 制限酵素及び Sma I 制限酵素により消化した間に挿入連結してなる融合蛋白質発現ベクター。

【請求項4】 配列番号1のアミノ酸配列をコードする配列番号2の核酸塩基配列で示されるDNA断片を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 の EcoR I 制限酵素及び Sma I 制限酵素により消化した間に挿入連結してなる請求項3記載の融合蛋白質発現ベクター。

【請求項5】 請求項3又は4記載の融合蛋白質発現ベクターで形質転換した形質転換大腸菌を培地中で培養し、菌体内に可溶性蛋白質として産生するグルタチオン-S-トランスフェラーゼ=単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質を採取することを特徴とする組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼの製造方法。

【請求項6】 形質転換大腸菌が E.coli BL21 (DE3) / pLysS, pGSTThP (FERM P-15610) であることを特徴とする請求項5記載の単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、単純ヘルペスウイルス1型由来のプロテアーゼをグルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結した融合蛋白質型の組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ及びその製造方法に関する。本発明の方法で製造される組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼは、該融合蛋白質型の組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼを利用する、プロテアーゼ活性阻害物質の阻害活性評価のために用いることができる。即ち、本発明の組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼの有する優れたプロテアーゼ活性を利用し、該プロテアーゼ活性を阻害する物質の迅速なスクリーニングに適する評価方法に好適である。

【0002】

【従来の技術】 ヘルペスウイルスのうち、単純ヘルペスウイルス1型；HSV-1は、成人の多くが感染してお

り、三叉神経節に潜伏感染する。一般には、重篤な症状を示すことはないが、種々の付加的な要因（疲労蓄積、紫外線照射、外傷、薬剤使用時など）を契機として、活動の活性化がなされ、角膜炎、カポジ水痘様発疹症、口唇ヘルペスなどの症状を起こす。即ち、潜伏感染者の免疫系に何らかの不良・障害が生じた際、不快な症状を発するもので、他の疾患との合併をも頻発する。

【0003】 抗ヘルペスウイルス剤としては、核酸系抗ウイルス剤であるアシクロビル（ACV；Acyclovir）が、そのチミジンキナーゼ阻害活性、DNAポリメラーゼによるウイルス遺伝子複製過程の選択的な阻害作用を利用するものとして化学療法に用いられている。核酸系抗ウイルス剤は、対処療法として有効性が極めて高いが、次第にこれら核酸系抗ウイルス剤に対する耐性を示すウイルス株が出現してきている現状がある。この耐性株の出現は、DNAポリメラーゼ等に対する阻害作用を利用する核酸系抗ウイルス剤に頻繁に報告される現象であり、非核酸系抗ウイルス剤の開発への契機・動機となっている。

【0004】 非核酸系抗ウイルス剤の一方は、これらウイルス遺伝子を閉じ込めるキャプシドを形成するコア蛋白質とウイルス固有の酵素蛋白質等、或いはウイルス外殻のエンベロープを形成する蛋白質群、これら蛋白質の翻訳・成熟を阻害して、ウイルス粒子の生成を阻害する薬剤の開発である。具体的には、前記するウイルス固有の蛋白質は、ウイルス遺伝子からポリペプチド鎖に翻訳され、その後切断を受け、個々の蛋白質となるが、その過程に関与するウイルス由来の切断酵素；プロテアーゼの阻害剤の開発である。

【0005】 ヘルペスウイルス自体は、その宿主細胞中での培養は困難であり、天然のウイルス由来プロテアーゼに換えて、遺伝子組換えによる組換え型ウイルスプロテアーゼは、その阻害剤の開発に不可欠である。単純ヘルペスウイルス1型；HSV-1由来プロテアーゼの遺伝子DNAは、ゲノム上において、その存在位置が特定されており、UL26遺伝子上の635アミノ酸からなる翻訳領域（Open ReadingFrame）にコードされている（F. Liu and B. Roizman, J. Virology 65, p.5149-5156 (1991) を参照）。特に、この635アミノ酸のN末から247アミノ酸の部分が、HSV-1由来プロテアーゼの機能を持ち、自らのプロテアーゼ活性により、このAla²⁴⁷ -- Ser²⁴⁸の間で切断を受けることが判明している（S.P. Weinheimer et al., J. Virology 67, p.5813-5822 (1993)、F. Liu and B. Roizman, J. Virology 67, p.1300-1309 (1991)などを参照）。従って、HSV-1由来のウイルスプロテアーゼとは、前記247アミノ酸からなるものを示すものである。

【0006】 既に、組換え型のHSV-1由来ウイルスプロテアーゼの製造方法および得られた組換え型ウイルスプロテアーゼの酵素活性が報告されている。しかしな

から、その組換え型酵素の活性は十分な反応速度を示さず、プロテアーゼ活性阻害物質の阻害活性評価に利用する際、アッセイ法での酵素反応時間が不要に長くなる等の実用性に欠けるものであった。即ち、従来の組換え型のHSV-1由来ウイルスプロテアーゼは、プロテアーゼ活性阻害物質の探索を進めるにあたり、その効率的な評価を困難にし、引いては、プロテアーゼ活性阻害物質の探索自体をも遅延させる要因ともなっていた。そのため、より酵素反応活性に富む、組換え型ウイルスプロテアーゼの容易な製造方法の開発が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の解決しようとする課題は、プロテアーゼ酵素活性がより優れた組換え単純ヘルペスウイルスプロテアーゼを製造するための方法を提供することである。即ち、本発明の目的は、優れた酵素活性を保持する組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ、並びにその組換え微生物による生産と精製の方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく、単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼをコードするDNAを、種々の蛋白質をコードするDNAと連結して、当該蛋白質のC末に単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼを連結してなる融合型蛋白質を組換え微生物により生産させる研究を鋭意進めた。その結果、単純ヘルペスウイルス1型由来のプロテアーゼをグルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結した融合蛋白質の発現ベクターを調製し、該発現ベクターで形質転換した形質転換微生物を培養して、優れた酵素活性を保持する可溶性の融合蛋白質を、その菌体内に生産することができるとを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】本発明は、単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結してなる組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質である。好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列で示されるペプチド鎖からなる単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのC末に連結してなる組換え単純ヘルペスウイルス1

型プロテアーゼ融合蛋白質である。
【0010】さらに、本発明は単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖をコードするDNA断片を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 の EcoR I 制限酵素及び Sma I 制限酵素により消化した間に挿入連結してなる組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質発現ベクターである。特に、単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖をコードするDNA断片として、配列番号1のアミ

ノ酸配列をコードする配列番号2の核酸塩基配列で示されるDNA断片を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 の EcoR I 制限酵素及び Sma I 制限酵素により消化した間に挿入連結してなる融合蛋白質発現ベクターである。

【0011】この融合蛋白質発現ベクターは、配列番号1のアミノ酸配列をコードする配列番号2の核酸塩基配列で示されるDNA断片から、該DNA断片の3'末端を Hind III 制限酵素による消化後、DNA鎖を伸長して末端を平滑化し、平滑化された該DNA断片の5'末端に EcoR I 制限酵素による消化端を形成した、末端処理DNA断片とし、該末端処理DNA断片を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 の EcoR I 制限酵素及び Sma I 制限酵素により消化した間に挿入連結することにより調製される。

【0012】さらに、本発明は前記融合蛋白質発現ベクターで形質転換した形質転換大腸菌を培地中で培養し、菌体内に可溶性蛋白質として産生するグルタチオン-S-トランスフェラーゼ=単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質を採取することを特徴とする組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼの製造方法である。そして、上記形質転換大腸菌としては、例えば E. coli BL21 (DE3) / pLysS. pGSTThHP (FERM P-15610) を用いることができる。

【0013】本発明の組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼを製造する方法は、具体的には、前記融合蛋白質発現ベクターとして、図1に示す構成の発現ベクター-pGSTThHP を用いて大腸菌株 E. coli BL21 (DE3) pLysS株を形質転換した 組み換え大腸菌株 E. coli BL21 (DE3) / pLysS. pGSTThHP (FERM P-15610) を培養し、その菌体の細胞中に可溶性蛋白質として生産されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ=単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質を採取することからなる製造方法である。即ち、培養後、破菌し、遠心により上清に分画される可溶性蛋白質として分離されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ=単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質を、当該融合蛋白質を構成するグルタチオン-S-トランスフェラーゼ領域を利用してアフィニティークロマトグラフ法により精製・取得する方法である。なお、本発明において、単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖とは、天然の単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域にあたる配列番号1のアミノ酸配列のC末に、それに連続して当該ウイルス遺伝子上にコードされる単純ヘルペスウイルス1型に由来するアミノ酸配列が付加させるもの、或いは、これら天然の単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域中にプロテアーゼ活性に影響を与えない範囲でアミノ酸残基の変換、欠損、挿入を有するものを意味する。これらのアミノ酸配列の改変は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする天然の塩基配列、具

体的には、配列番号2の核酸塩基配列を基に、PCR法等を利用して改変するアミノ酸配列をコードする核酸塩基配列への改変を行うことで、対応する改変ペプチド鎖に翻訳・調製を行うことができる。例えば、天然の単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域における、個々のウイルス株間でのアミノ酸配列の変異に従い、配列番号1のアミノ酸配列中の対応するアミノ酸残基を変換するものも、単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ領域を実質的に含んでなるペプチド鎖となる。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の組換え単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ(HSV-1プロテアーゼ)において、この融合蛋白質のN末を構成するグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)は、市販されているグルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech 社製)にコードされている既知の核酸塩基配列、それに基づき翻訳されるアミノ酸配列を持つものである。

【0015】一方、前記する融合蛋白質のC末を構成するHSV-1プロテアーゼ領域は、上記の配列番号1のアミノ酸配列であり、配列番号2の核酸塩基配列に基づき翻訳される。この配列番号2の核酸塩基配列は、以下に示すように、HSV-1(F)株に由来するものである。当該HSV-1(F)株のUL26遺伝子を有するプラスミド pRB4057 (F. Liu and B. Roizman, J. Virology 65, p.206-212 (1991)、F. Liu and B. Roizman, J. Virology 65, p.5149-5156 (1991)などを参照)中の核酸塩基配列とその翻訳域は一致するものである。

【0016】本発明の組換え型HSV-1プロテアーゼは、以下の手順に従い、該組換え型HSV-1プロテアーゼをコードするDNAを含んでなる環状プラスミドベクターを構築し、その環状プラスミドベクターを導入して形質転換してなる該組換え型HSV-1プロテアーゼの生産能を有する形質転換微生物を作製し、該形質転換微生物を培養して、その培養物より該組換え型HSV-1プロテアーゼを単離・採取することができる。

【0017】〔組換え型HSV-1プロテアーゼをコードするDNAを含んでなる環状プラスミドベクターの構築、及び該プラスミドベクターを導入した形質転換微生物の調製〕先ず、前記するUL26遺伝子を有するプラスミド pRB4057 を鋳型として、該HSV-1プロテアーゼの領域、具体的には、Met¹~Ala²⁴⁷の247アミノ酸残基からなるペプチド鎖をコードするDNAを、PCR法により増幅し調製する。その際、開始コドンATG(Met)の5'側に制限酵素EcoRI切断部位を、Ala²⁴⁷をコードするGCGの直後に本来存在するSer²⁴⁸をコードするAGCに換えて終止コドンTGAを導入する。同時に3'側下流の非翻訳域に制限酵素HindIII切断部位をも導入した。即ち、既に解明されているUL26遺伝子の塩基配列を参照して、これらの人為的な塩基配列を付加し

たプライマーを合成し、それを用いてPCR法による増幅を行う。

【0018】得られたDNA断片は、図2に示す塩基配列となり、即ち、上記の核酸塩基配列(II)となる。次いで、このDNA断片を制限酵素EcoRIとHindIIIで消化して、それぞれ切断端を形成する。一方、特開平3-164184号記載のプラスミドpMT1のクローニング・サイトEcoRIとHindIII部位の間に、前記DNA断片を連結挿入して、図1に構成を模式的に示すプラスミドpMTHPに構成する。このプラスミドpMTHPを、一旦大腸菌JM109株に導入して形質転換する。この組換え菌を培養して、プラスミドpMTHPを大量に調製する。破菌して、プラスミドpMTHPを単離・分取する。

【0019】プラスミドpMTHPを制限酵素HindIIIで消化した後、切断部のHindIIIの突出末端を大腸菌由来のDNAポリメラーゼIラージフラグメントを利用して、平滑末端化する。その後、制限酵素EcoRIで切断して、開始コドンATG(Met)の5'側に制限酵素EcoRI切断部位を、終止コドンTAGの下流に平滑末端をそれぞれ有するDNA断片とする。得られるDNA断片を、市販のGST発現ベクターpGEX-4T-1(Pharmacia Biotech社製)のEcoRI-SmaI部位の間に連結挿入して、図1に構成を模式的に示すプラスミドpGSTThHPに構成する。即ち、pGEX-4T-1のtacプロモーター(Ptac)とその直後に存在するGST遺伝子とHSV-1プロテアーゼ遺伝子が連結された、融合蛋白質をコードする翻訳域が形成される。なお、このGST遺伝子とHSV-1プロテアーゼ遺伝子との連結部分は、既に報告されているGSTとHSV-1プロテアーゼの融合蛋白質発現プラスミドpGST247(C. L. DiIanni et al., J. Biological Chemistry 268(34), p.25449-25454 (1993)を参照)と実質的に同じ塩基配列となっている。

【0020】プラスミドpGSTThHPを、宿主大腸菌E. coli BL21(DE3) pLysS株に導入して形質転換する。プラスミドpGSTThHP中に存在するマーカー遺伝子Amprを利用して、アンピシリン耐性を示す形質転換株を選別し、加えて、GSTとHSV-1プロテアーゼの融合蛋白質を生産するか否かを、ヤギ抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認して、該プラスミドpGSTThHPを保有する組換え菌のスクリーニングを行う。本発明者らは、このスクリーニングの結果、プラスミドpGSTThHPを保持し、且つGSTとHSV-1プロテアーゼの融合蛋白質生産能を示す複数の組換え菌株を得て、その一つにE. coli BL21(DE3)/pLysS.pGSTThHPの識別のための呼称を付し、平成8年5月1日に工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-15610として寄託している。

【0021】なお、前記の組換え菌においては、プラスミドベクターからmRNAへの転写誘導には、tacプロモーター(Ptac)を利用しているが、転写・翻訳を司る

10

20

30

40

50

プロモーターとして、tac プロモーター (Ptac) のみならず、宿主細胞において汎用公知のプロモーターを用いても勿論よい。

【0022】〔GST-HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質型の組換え型HSV-1プロテアーゼの調製〕組換え菌による融合蛋白質の培養生産と培養物からの活性な組換え型HSV-1プロテアーゼの分離・精製は、例えば、以下の手順で行うことができる。

【0023】先の工程でスクリーニングしたプラスミド pGSTThHP を保有する組換え菌を、アンピシリン及びクロムフェニコールを添加した1 lの2×YTを培地を用いて、5 l容三角フラスコ中で30℃、6時間振とう培養する。次いで、GST-HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の発現を誘導するため、培地にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度 0.1 mM となる量添加する。引き続き、30℃、14時間振とう培養を行い、得られる培養液を遠心分離して集菌する。

【0024】集菌した菌体は、グルタチオンセファロース 4B カラム平衡化バッファー液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0、以降、バッファー液 A と称する) 中に懸濁し、超音波によって菌体を破碎する。その後、遠心分離によって、不溶性画分を分離し、可溶性蛋白質を含有する上清を得る。この上清中に可溶性蛋白質として溶解している該 GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質のみを以下の手段で単離・精製する。

【0025】まず、分取される上清を、バッファー液 A で平衡化されたグルタチオンセファロース 4B カラムに負荷し、上清に溶解している GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質をカラムに特異的に吸着させる。カラムを、バッファー液 A により洗浄し、未吸着分を洗い出す。その後、20 mM 還元型グルタチオンを添加したバッファー液 A によって、カラムに吸着していた GST-HSV-1 プロテアーゼを溶出させる。このカラムから溶出された GST-HSV-1 プロテアーゼを含む画分を、一旦限外濾過膜で濃縮する。この濃縮液を、0.2 M NaCl, 0.1 M リン酸ナトリウム, pH7.2 (以降、バッファー液 B と称する) によって平衡化されたセファクリル S-300 HR カラムに負荷し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行う。このゲル濾過を施した GST-HSV-1 プロテアーゼを含有する画分を、再び限外濾過膜で濃縮する。これを、50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5 (以降、バッファー液 C と称する) で平衡化されたセファデックス G-25 カラムに負荷して、溶媒をバッファー液 C に置き換え、精製済みの GST-HSV-1 プロテアーゼ溶液を得る。最後に、精製済みの GST-HSV-1 プロテアーゼ溶液を、限外濾過膜による濃縮を行い、終濃度 50 % になるようにグリセロールを添加し、-20℃にて保存する。

【0026】なお、前記の GST-HSV-1 プロテアーゼ溶液に含まれる融合蛋白質濃度は、融合蛋白質を構成する

GSTの酵素活性を基にして算定することができる。また、混在する蛋白質濃度は無視できる程度に純化されており、総蛋白質重量を基に算定してもよい。

【0027】〔合成基質を用いた in vitro における組換え型 HSV-1 プロテアーゼ活性の測定〕HSV-1 プロテアーゼは、U_L26 遺伝子翻訳産物である 635 アミノ酸残基からなるペプチド鎖の Ala²⁴⁷-Ser²⁴⁸の間、Ala⁶¹⁰-Ser⁶¹¹の間、この両者を選択的に切断することが報告されている。また、これら切断部位を含む部分アミノ酸配列からなる合成ペプチドを基質としても、同じくプロテアーゼ活性が見られることも確認されている (C. L. DiIanni et al., J. Biological Chemistry 268 (34), p.25449-25454 (1993) を参照)。この報告を参照して、Ala²⁴⁷-Ser²⁴⁸の間の切断部位に対応する、下記する合成基質を作成した。

H-Thr-Tyr-Leu-Gln-Ala-Ser-Glu-Lys-Phe-Lys-Met-Trp-Gly-NH₂

この合成基質は、HSV-1 プロテアーゼで切断されると、下記の二種のペプチド断片が得られる。

H-Thr-Tyr-Leu-Gln-Ala-OH H-Ser-Glu-Lys-Phe-Lys-Met-Trp-Gly-NH₂

前記の合成基質は予めジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、この合成基質を終濃度 500 μM、組換え型 HSV-1 プロテアーゼを 0.25 μM となるようにプロテアーゼ活性測定用バッファーに添加する。なお、この時点で、反応液の組成は、終濃度 25 % グリセロール, 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 2% DMSO, pH 7.5 となるように、プロテアーゼ活性測定用バッファーを調製する。この酵素反応液を、30℃で1時間インキュベーションした後、終濃度 0.1 % となるようにトリフルオロ酢酸 (TFA) を添加して反応を停止させる。その反応液中に残る合成基質、及び合成基質の酵素反応で切断された断片を、それぞれ 0-50 % アセトニトリル, 0.1 % TFA (30分間) の直線濃度勾配の条件で、逆相 HPLC により分析を行う。

【0028】一方、予め前記の合成基質 C 末端側切断産物の標準品を別途合成し、合成基質とこの C 末端側切断産物を、酵素反応液と同じ組成のバッファー液にそれぞれ溶解した標準試料により、同じく逆相 HPLC により分析を行う。この標準スペクトルとの対比により、組換え型 HSV-1プロテアーゼによって合成基質の Ala-Ser の結合を特異的に切断することの確認を行った。一例を、図3に示す。合成基質のピークが減少し、それに伴い、C 末端側切断産物のピーク、その直前に N 末端側切断産物のピークが出現している。なお、酵素反応速度は、C 末端側切断産物のピーク強度を基に、算出することができる。

【0029】なお、上記組み換え大腸菌株 E.coli BL21 (DE3) / pLysS, pGSTThHP (FERMP-15610) を培養し、その菌体から可溶性画分に含まれる蛋白質として分離さ

れる本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼは、既に報告されている GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質型の組換え型 HSV-1 プロテアーゼと比較して、酵素活性の指標となる k_{cat}/k_m の値による比較においても、従来報告されている融合蛋白質型の組換え型 HSV-1 プロテアーゼが、 $k_{cat}/k_m = 1.05 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ であるのに対して (C. L. DiIanni et al., J. Biological Chemistry 268(34), p.25449-25454 (1993) を参照)、本発明では、 $k_{cat}/k_m = 4.5 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ と少なくとも 4 倍を超える向上が得られている。更には、従来報告されていた、直接発現により製造された組換え型 HSV-1 プロテアーゼにおける測定結果では、 $k_{cat}/k_m \leq 2.27 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ であり (P. L. Darke et al., J. Biological Chemistry 269(29), p.18708-18711 (1994) を参照)、それと比較しても 2 倍を超える向上が得られている。即ち、本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼは、従来の組換え型 HSV-1 プロテアーゼと比較して、酵素の反応速度が著しく改善されたものであり、HSV-1 プロテアーゼに対する阻害物質の評価を格段に容易且つ迅速に行えるものである。

【0030】以下に、具体例により本発明の組換え単純ヘルペスウイルス 1 型プロテアーゼ、その製造方法、また、本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼの有する優れたプロテアーゼ活性について詳細に説明する。

【0031】〔実施例 1〕単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 由来セリンプロテアーゼ活性を有する U_L26 遺伝子翻訳産物の N 末端から 247 番目までのアミノ酸配列からなるペプチド鎖を、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の C 末端に連結した GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質型の組換え型 HSV-1 プロテアーゼを下記する手段で調製し、該組換え蛋白質の HSV-1 プロテアーゼ活性を評価した。

【0032】以下に、該 GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質型の組換え型 HSV-1 プロテアーゼの発現に用いるプラスミドベクターの構築、該プラスミドベクターを導入し形質転換した組換え大腸菌の調製、組換え型 HSV-1 プロテアーゼの調製、合成基質及び組換え基質を用いた *in vitro* における HSV-1 プロテアーゼ活性測定系の構築について順次述べる。なお、この実施例で用いる制限酵素はいずれも市販のものである。

【0033】〔組換え型 HSV-1 プロテアーゼの発現ベクターの構築〕先ず、ウイルスゲノム中の U_L26 遺伝子を有するプラスミド pRB4057 を鋳型として、N 末端から 247 アミノ酸残基 (Met¹ ~ Ala²⁴⁷) からなるペプチド鎖をコードする DNA の上流端に、制限酵素 EcoR I 切断部位を、その下流に終止コドン TGA と制限酵素 Hind III 切断部位をそれぞれ持つ DNA 断片を PCR 法により増幅し、調製した。

【0034】次いで、プラスミド pMT1 の EcoR I-Hind III 部位に先に調製した両端に EcoR I-Hind III の

切断部位を有する DNA 断片を連結挿入したプラスミド pMTHP を得た。このプラスミド pMTHP を、大腸菌 JM109 株に導入し形質転換して、得られる組換え菌を培養して、該プラスミド pMTHP を大量に調製した。該プラスミド pMTHP の構成の概要は図 1 に示す。

【0035】次いで、このプラスミド pMTHP を制限酵素 Hind III で切断後、大腸菌由来 DNA ポリメラーゼ I ラージフラグメントにより Hind III の突出末端を平滑末端にして、更に制限酵素 EcoR I で切断することで上流端に EcoR I の切断部位、下流端に平滑末端を持つ HSV-1 プロテアーゼをコードする DNA 断片を調製した。該 DNA 断片を市販されているグルタチオン S-トランスフェラーゼ発現ベクター pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech 製) の EcoR I-Sma I 部位に、連結挿入してプラスミド pGSTThHP を構築した。

【0036】〔組換え型 HSV-1 プロテアーゼ発現ベクターを導入し形質転換した組換え大腸菌の調製〕先の工程で構築したプラスミドベクター pGSTThHP を大腸菌 E.coli BL21(DE3) pLysS 株に導入し形質転換した。マーカー遺伝子によるアンピシリン耐性、及びヤギ抗 GST 抗体を用いるウエスタンブロッティングによるスクリーニングを行い、該プラスミドベクター pGSTThHP を有する組換え菌を得た。なお、この組換え菌の一つに E.coli BL21 (DE3) / pLysS. pGSTThHP の識別のための呼称を付し、この菌株を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号 FERM P-15610 として寄託した。なお、宿主大腸菌 BL21(DE3) pLysS 株は、組換え型 HSV-1 プロテアーゼの直接発現に用いられた形質転換株においても、利用された汎用の宿主である (P. L. Darke et al., J. Biological Chemistry 269(29), p.18708-18711 (1994) を参照)。

【0037】〔GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質型の組換え型 HSV-1 プロテアーゼの調製〕該発現ベクター pGSTThHP を有する組換え菌 E.coli BL21 (DE3) / pLysS. pGSTThHP (FERM P-15610) を、1 l の 2 x YT とアンピシリン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びクロラムフェニコール 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培地を用いて、5 l 容三角フラスコで 30 $^{\circ}\text{C}$ 、6 時間、250 rpm で振とう培養した。その後、終濃度 0.1 mM となるようにイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加して、該 GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質の発現を誘導した。更に、30 $^{\circ}\text{C}$ 、14 時間、250 rpm で振とう培養を行い、その培養液を遠心分離して集菌した。菌体をグルタチオンセファロース 4 B カラム平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0、バッファー液 A) 中に懸濁し、超音波によって菌体を破碎後、遠心分離によって菌体中に可溶性蛋白質として存在している該 GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質を含有する上清を得た。

【0038】別に同様の条件で、先ず 16 時間培養した後、IPTG を添加して 3 時間培養した菌体から、同様に可

溶性蛋白質として菌体中に生産された該 GST-HSV-1プロテアーゼを含む上清を得た。なお、上述の培養条件を条件1、この培養条件を条件2とする。

【0039】この両条件で培養した際、上清中に可溶性蛋白質として含まれる該 GST-HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の産出量を比較する目的で、IPTGを添加する直前、及び培養終了時の菌体の破砕物を SDS-PAGE 法で分析した。なお、宿主 *E.coli* BL21(DE3) pLysSに由来する蛋白質を区別するため、宿主 *E.coli* BL21(DE3) pLysSの培養菌体破砕物をも同時に分析した。加えて、遠心分離によって分取した上清及び不溶性画分をも分析した。これらの分析結果を図4に示す。何れの場合にも、GST-HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の分子量に対応する位置に、IPTGを添加する直前では僅かであったものが、培養終了時には明確なバンドとして現われている。なお、条件1では、GST-HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の主要部分は、上清に可溶性蛋白質として存在するが、条件2では、不溶性画分に存在する比率が高くなっている。

【0040】なお、図4において、上部の結果は、条件1による培養、下の結果は、条件2による培養におけるものであり、また、レーン1は、分子量マーカー、レーン2は、宿主 *E.coli* BL21 (DE3) pLysS の培養菌体破砕物、レーン3は、IPTGを添加する直前の組換え菌 *E.coli* BL21 (DE3) / pLysS. pGSTThHP の培養菌体破砕物、レーン4は、組換え菌 *E.coli* BL21 (DE3) / pLysS. pGSTThHP 培養終了時の菌体破砕物、レーン5は、培養終了時の菌体破砕物中の上清画分、レーン6は、培養終了時の菌体破砕物中の不溶性画分の分析結果をそれぞれ示す。

【0041】得られた上清をバッファー液Aで平衡化されたグルタチオンセファロース 4Bカラムに負荷し、GST-HSV-1 プロテアーゼ融合蛋白質をカラムに特異的に吸着させた。カラムを、バッファー液Aによる洗浄を行った後に、20 mM 還元型グルタチオンを含むバッファー液Aによって、カラムに吸着されている GST-HSV-1プロテアーゼを溶出させた。グルタチオンセファロース 4Bカラムから溶出された GST-HSV-1プロテアーゼを含む画分を、限外濾過膜で濃縮してから、0.2 M NaCl, 0.1 M リン酸ナトリウム, pH 7.2 (バッファー液B) によって平衡化されたセファクリル S-300 HR カラムに負荷し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。セファクリル S-300 HR カラムより溶出された GST-HSV-1 プロテアーゼを含有する画分を、限外濾過膜で濃縮し、50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5 (バッファー液C) で平衡化されたセファデックス G-25 カラムに負荷した。この操作によって、GST-HSV-1 プロテアーゼの溶媒をバッファー液Cに置換した。最後に、バッファー液Cに溶解する GST-HSV-1 プロテアーゼ溶液を限外濾過膜による濃縮を行い、その蛋白質溶液に、終濃度 50 % になるよ

うにグリセロールを添加し、-20 °C に保存した。

【0042】なお、グルタチオンセファロース 4B カラムによる精製の程度を、SDS-PAGE法で分析した結果を図5に示す。また、セファクリル S-200 HR カラムによるゲル濾過クロマトグラフィーの結果を図6に示す。条件1、2の何れにおいても、54 kDa 付近の主要なバンドに付随し、僅かに分子量の小さい副次的なバンドが見い出されている。これは、宿主 *E.coli* BL21 (DE3) pLysS 中で僅かに分解を受けるものが存在することを示す。精製が終了した時点で、条件1、2の標品を分析したところ、図7に示すとおり、純度に差はないが、上清から可溶性蛋白質として回収される収量は、条件2では培養液1 l 当たり 2.3 mg であるが、条件1では培養液1 l 当たり 0.56 mg でしかなかった。

【0043】図5及び図6において、左側に条件1による培養の結果、右側に条件2による培養の結果を対比しており、また、上部には、カラムからの溶出する蛋白質量の変化、下部には、各分取画分の SDS-PAGE 分析結果をそれぞれ示す。図7においては、レーン2は、条件1による培養、レーン3は、条件2による培養において得られる、最終精製後の標品の SDS-PAGE 分析結果をそれぞれ対比して示す。

【0044】[合成基質を用いた *in vitro* における組換え型 HSV-1 プロテアーゼ活性測定] HSV-1 プロテアーゼ活性測定用バッファーに、ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解した合成基質を終濃度 500 μ M 及び HSV-1 プロテアーゼを 0.25 μ M となるように添加した。この時点で、この HSV-1 プロテアーゼ活性測定用バッファーの組成は終濃度 25 % グリセロール, 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 2 % DMSO, pH 7.5 となる。この反応液を、30 °C で1時間インキュベーションした後、終濃度 0.1 % となるようにトリフルオロ酢酸 (TFA) を添加して反応を停止させた。その反応液及び合成基質の C 末端側切断産物の標準品をそれぞれ 0-50 % アセトニトリル, 0.1 % TFA (30分間) の直線濃度勾配の逆相 HPLC により分析を行い、HSV-1 プロテアーゼによって合成基質の Ala-Ser の結合を特異的に切断するかの確認を行った。

【0045】その結果、図3に示すとおり、HSV-1 プロテアーゼによって切断された合成基質の C 末端側の断片と C 末端側切断産物の標準品の保持時間が一致した。なお、HSV-1 プロテアーゼによって切断された合成基質の C 末端側切断産物を逆相 HPLC によって分取し、宝酒造にアミノ酸配列分析を委託した結果、C 末端側切断産物の標準品と同一の配列であることが判明した。この結果から、該 HSV-1プロテアーゼによって合成基質の Ala-Ser の結合を特異的に切断することが確認された。

【0046】なお、前記する培養条件の異なる、条件1と条件2の酵素活性を比較したところ、図8に示すとおり

り、違いは誤差の範囲であり、両者の間では、収量の差違はあるが、純度自体には差がないものであることが確認できた。

【0047】本発明の可溶性蛋白質として菌体中で生産される組換え型 HSV-1 プロテアーゼの酵素活性の優劣を評価するため、基質濃度 S を種々に換え、その際の切断速度 V の測定値を Lineweaver-Burk プロットして、図9に示す結果を得た。なお、酵素蛋白質濃度は、 $0.25 \mu\text{M}$ とした。反応液の組成は、基質濃度 S を除き、上記の条件と同じである。酵素活性の指標、 K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} を算出したところ、 $K_m = 251 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max} = 28.3 \text{ pmol/min}$ 、 $k_{\text{cat}} = 1.13 \text{ min}^{-1}$ が得られた。

【0048】[市販化合物による組換え型 HSV-1 プロテアーゼにたいする酵素活性の阻害有無の確認] HSV-1 プロテアーゼは、セリンプロテアーゼである点を考慮して、市販されているセリンプロテアーゼに対する阻害化合物により、該組換え型 HSV-1 プロテアーゼの活性が阻害を受けるか否かを確認した。

【0049】HSV-1 プロテアーゼ活性測定用バッファー 終濃度 10 % グリセロール、25 mM Tris-HCl, 50 mM Na \times 20

各種プロテアーゼ阻害物質	添加濃度	酵素活性阻害率
APMSF	1 mM	5 %
DFP	0.1 mM	32 %
DFP	0.5 mM	78 %
DFP	1 mM	87 %
Pefabloc/SC	1 mM	53 %
PMSF	1 mM	8 %
TLCK	1 mM	8 %
TPCK	0.1 mM	15 %
E-64	1 mM	4 %

【0051】加えて、当該組換え型 HSV-1 プロテアーゼは、セリンプロテアーゼであり、酵素活性部位への種々の遷移金属との結合によって酵素活性の低下が引き起こされることを確認するべく、表2に示す遷移金属イオンを添加して、その際の酵素活性阻害を評価した。その※

各種金属カチオン	添加濃度	酵素活性阻害率
Mg $^{2+}$	1 mM	1 %
Ca $^{2+}$	1 mM	1 %
Mn $^{2+}$	1 mM	6 %
Fe $^{3+}$	1 mM	61 %
	0.1 mM	22 %
	0.01 mM	4 %
	0.001 mM	5 %
Co $^{2+}$	1 mM	38 %
Ni $^{2+}$	1 mM	53 %
Cu $^{2+}$	1 mM	95 %
	0.1 mM	81 %
	0.01 mM	30 %
	0.001 mM	6 %
Zn $^{2+}$	1 mM	96 %
	0.1 mM	95 %
	0.01 mM	26 %
	0.001 mM	3 %
Mo $^{2+}$	1 mM	5 %

【0053】以上に示した通り、本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼは合成基質においては、天然の HSV-1 プロテアーゼと同様の選択性をもつプロテアーゼ活性を示すことが確認された。加えて、このプロテアーゼ活性が

*Cl, 0.5 mM DTT, pH 7.5 (アッセイバッファー液Bと称する) に合成基質を終濃度 $500 \mu\text{M}$ 、組換え型 HSV-1 プロテアーゼを $0.25 \mu\text{M}$ 及び表1に記載した市販化合物をそれに併記した終濃度となるように添加し、 30°C で1時間 インキュベーションを行った。それを逆相 HPLC で分析し、残余するプロテアーゼ活性を測定した。表1に示す結果は、市販化合物を添加しない場合を、酵素活性 100 % としてプロテアーゼ活性を算出し、活性の減少を阻害率として表記している。本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼに対する阻害が有意に高く見いだされるものは、1 mM Diisopropyl Fluorophosphate (DFP) を添加した場合で、その阻害率は 87 % であった。なお、DFP による阻害 (C.L. DiIanni et al., J. Biological Chemistry 268(34), p.25449-25454 (1993) を参照) は、既に報告されている結果と対応している。また、Pefabloc/SC は 1 mM において 53%、TPCK は 0.1 mM において 15% の阻害が見られる。

【0050】

【表1】

※結果、表2に示すとおり、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} により顕著な活性阻害を受けることが確かめられた。

【0052】

【表2】

その切断配列の両端に更なるペプチド鎖が存在するものにおいても存在するか否かを検証する目的で、マルトース結合蛋白質とアデニレートキナーゼを Ala 247 -Ser 248 間の切断部位に相当する 17 アミノ酸残基、Ala

⁶¹⁰ - Ser⁶¹¹間の切断部位に相当する17アミノ酸残基で連結した組換え基質を作製し、その切断を確認した。

【0054】[MBP-AS-ADK 融合蛋白質(組換え基質)発現ベクターの構築] NEW ENGLAND BIOLABS (NEB) 製のマルトース結合蛋白質(MBP)発現ベクター-pMAL-c2の EcoRIと HindIII部位にアデニレートキナーゼ(ADK)遺伝子を導入し、更に XmnI と EcoRI で切断したベクター断片に、Ala²⁴⁷ - Ser²⁴⁸間の切断部位に相当する17アミノ酸残基(IAGHTYLQA-SKFKMWGに対応する)、Ala⁶¹⁰ - Ser⁶¹¹間の切断部位に相当する17アミノ酸残基(AEAGALVNA-SSAAHVVDVに対応する)に相当した2種類のHSV-1プロテアーゼの切断配列をコードする合成リンカーをそれぞれ連結し、プラスミド pMALNAK及び pMALCAKを構築した。

【0055】[組換え基質発現ベクターを導入し形質転換した組換え大腸菌の調製] 先の工程で構築した2種類の発現ベクター pMALNAK及び pMALCAKをそれぞれ大腸菌 HB101株に導入し形質転換した。マーカー遺伝子によるアンピシリン耐性及び制限酵素解析を行い、該発現ベクター pMALNAK 及び pMALCAK を有する組換え菌を得た。

【0056】[組換え基質の調製] 該発現ベクター pMALNAK及び pMALCAKを有する組換え菌を、それぞれ100 mlの2 x YT とアンピシリンを含む培地を用いて 500 ml 容三角フラスコで 30 °C、4 時間振とう培養した後、終濃度 1 mM となるように IPTG を添加して、該組換え基質の発現を誘導した。更に、30 °C で 16 時間振とう培養を行い、その培養液を遠心分離して集菌した。菌体をアミロースカラム平衡化バッファー(50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5、以降、バッファー液Dと称する)中に懸濁し、超音波によって菌体を破碎後、遠心分離によって該組換え基質を含有する上清を得た。

【0057】次いで、先の上清をバッファー液Dで平衡化されたアミロース カラムに負荷し、組換え基質をカラムに特異的に吸着させ、バッファー液Dによる洗浄を行った後、10 mM マルトースを含むバッファー液Dによってカラムから組換え基質を溶出させた。アミロースカラムから溶出された組換え基質を含む画分を限外濾過膜で濃縮してから、終濃度 50 % になるようにグリセロールを添加し、-80°C に凍結保存した。

【0058】前記する二種の組換え基質、即ち、大腸菌*

配列

Met	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Asp	Arg	Met	Glu	Glu	Pro	Leu	Pro
1				5					10				15	
Asp	Arg	Ala	Val	Pro	Ile	Tyr	Val	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Tyr
				20					25				30	
Asp	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr	Val
				35					40				45	
Arg	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Asn	Pro	Leu	Pro	Ile	Asn	Val	Asp
				50					55				60	

*由来のマルトース結合蛋白質(MBP)とブタ・アデニレートキナーゼ(ADK)の間に Ala²⁴⁷-Ser²⁴⁸間の切断部位に相当する17アミノ酸残基、Ala⁶¹⁰-Ser⁶¹¹間の切断部位に相当する17アミノ酸残基をそれぞれ挿入した融合蛋白質は、図10に示すとおり、該発現ベクター-pMALNAKを有する組換え菌 E. coli HB101 / pMALNAK 株、発現ベクター pMALCAK を有する組換え菌 E. coli HB101 / pMALCAK 株、この二種の菌体破碎物中、可溶性画分に主として回収される。図11に例示するとおり、アミロースカラムによる精製することで、分子量 60 kDa 付近に見られる単一のバンドを与えるものとして得られた。

【0059】[組換え基質を用いた in vitro における HSV-1プロテアーゼ活性の確認] HSV-1 プロテアーゼ活性測定用バッファーに、2 種類の該組換え基質をそれぞれ 30 µg 及び該組換え型 HSV-1 プロテアーゼをそれぞれ 1~3 µg 添加し、30 °C で 1 時間 インキュベーションした後、2 x サンプルバッファーを添加することで反応を停止させた。その反応液を SDS-PAGE で分析し、銀染色を行った。図12に示す通り、該 HSV-1 プロテアーゼにより切断された組換え基質の切断産物である MBP及び ADKのバンドがそれぞれ検出された。この結果、Ala²⁴⁷-Ser²⁴⁸間の切断部位、Ala⁶¹⁰-Ser⁶¹¹間の切断部位の両者を、本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼは切断することが確認された。

【0060】

【発明の効果】本発明の組換え型 HSV-1 プロテアーゼは、従来の組換え型 HSV-1 プロテアーゼと比較して、酵素の反応速度が著しく改善されたものであり、HSV-1 プロテアーゼに対する阻害物質の評価を格段に容易且つ迅速に行えるものである。加えて、本発明の製造方法により、かかる酵素活性に優れた組換え型 HSV-1 プロテアーゼを容易に、且つ均一、再現性よく製造することができる。

【0061】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：257

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

17

18

His Arg Ala Gly Cys Glu Val Gly Arg Val Leu Ala Val Val Asp		
65	70	75
Asp Pro Arg Gly Pro Phe Phe Val Gly Leu Ile Ala Cys Val Gln		
80	85	90
Leu Glu Arg Val Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala Ile Phe Glu		
95	100	105
Arg Arg Gly Pro Pro Leu Ser Arg Glu Glu Arg Leu Leu Tyr Leu		
110	115	120
Ile Thr Asn Tyr Leu Pro Ser Val Ser Leu Ala Thr Lys Arg Leu		
125	130	145
Gly Gly Glu Ala His Pro Asp Arg Thr Leu Phe Ala His Val Ala		
150	155	160
Leu Cys Ala Ile Gly Arg Arg Leu Gly Thr Ile Val Thr Tyr Asp		
165	170	175
Thr Gly Leu Asp Ala Ala Ile Ala Pro Phe Arg His Leu Ser Pro		
180	185	190
Ala Ser Arg Glu Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Glu Ala Glu Leu		
195	200	205
Ala Leu Ser Gly Arg Thr Trp Ala Pro Gly Val Glu Ala Leu Thr		
210	215	220
His Thr Leu Leu Ser Thr Ala Val Asn Asn Met Met Leu Arg Asp		
225	230	235
Arg Trp Ser Leu Val Ala Glu Arg Arg Arg Gln Ala Gly Ile Ala		
240	245	250
Gly His Thr Tyr Leu Gln Ala		
255		

【0062】配列番号：2

配列の長さ：765

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

*配列の種類：genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号：mutation

30 存在位置：747..765

* 特徴を決定した方法：P

配列

GAATTC ATG GCA GCC GAT GCC CCG GGA GAC CGG ATG GAG GAG CCC	45
Met Ala Ala Asp Ala Pro Gly Asp Arg Met Glu Glu Pro	
1 5 10	
CTG CCA GAC AGG GCC GTG CCC ATT TAC GTG GCT GGC TTT TTG GCC	90
Leu Pro Asp Arg Ala Val Pro Ile Tyr Val Ala Gly Phe Leu Ala	
15 20 25	
CTG TAT GAC AGC GGG GAC TCG GGC GAG TTG GCA TTG GAT CCG GAT	135
Leu Tyr Asp Ser Gly Asp Ser Gly Glu Leu Ala Leu Asp Pro Asp	
30 35 40	
ACG GTG CGT GCG GCC CTG CCT CCG GAT AAC CCA CTC CCG ATT AAC	180
Thr Val Arg Ala Ala Leu Pro Pro Asp Asn Pro Leu Pro Ile Asn	
45 50 55	
GTG GAC CAC CGC GCT GGC TGC GAG GTG GGG CGG GTG CTG GCC GTG	225
Val Asp His Arg Ala Gly Cys Glu Val Gly Arg Val Leu Ala Val	
60 65 70	
GTC GAC GAC CCC CGC GGG CCG TTT TTT GTG GGA CTG ATC GCC TGC	270
Val Asp Asp Pro Arg Gly Pro Phe Phe Val Gly Leu Ile Ala Cys	
75 80 85	

19	GTG CAA CTG GAG CGC GTC CTC GAG ACG GCC GCC AGC GCT GCG ATT	20	315
	Val Gln Leu Glu Arg Val Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala Ile		
90		95	100
	TTC GAG CGC CGC GGG CCG CCG CTC TCC CGG GAG GAG CGC CTG TTG		360
	Phe Glu Arg Arg Gly Pro Pro Leu Ser Arg Glu Glu Arg Leu Leu		
105		110	115
	TAC CTG ATC ACC AAC TAC CTG CCC TCG GTC TCC CTG GCC ACA AAA		405
	Tyr Leu Ile Thr Asn Tyr Leu Pro Ser Val Ser Leu Ala Thr Lys		
120		125	130
	CGC CTG GGG GGC GAG GCG CAC CCC GAT CGC ACG CTG TTC GCG CAC		450
	Arg Leu Gly Gly Glu Ala His Pro Asp Arg Thr Leu Phe Ala His		
135		140	145
	GTC GCG CTG TGC GCG ATC GGG CGG CGC CTC GGC ACT ATC GTC ACC		495
	Val Ala Leu Cys Ala Ile Gly Arg Arg Leu Gly Thr Ile Val Thr		
150		155	160
	TAC GAC ACC GGT CTC GAC GCC GCC ATC GCG CCC TTT CGC CAC CTG		540
	Tyr Asp Thr Gly Leu Asp Ala Ala Ile Ala Pro Phe Arg His Leu		
165		170	175
	TCG CCG GCG TCT CGC GAG GGG GCG CGG CGA CTG GCC GCC GAG GCC		585
	Ser Pro Ala Ser Arg Glu Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Glu Ala		
180		185	190
	GAG CTC GCG CTG TCC GGA CGC ACC TGG GCG CCC GGC GTG GAG GCG		630
	Glu Leu Ala Leu Ser Gly Arg Thr Trp Ala Pro Gly Val Glu Ala		
195		200	205
	CTC ACC CAC ACG CTG CTT TCC ACC GCC GTT AAC AAC ATG ATG CTG		675
	Leu Thr His Thr Leu Leu Ser Thr Ala Val Asn Asn Met Met Leu		
210		215	220
	CGG GAC CGC TGG AGC CTG GTG GCC GAG CGG CGG CGG CAG GCC GGG		720
	Arg Asp Arg Trp Ser Leu Val Ala Glu Arg Arg Arg Gln Ala Gly		
225		230	235
	ATC GCC GGA CAC ACC TAC CTC CAG GCG TGA TGAAGATCTA AGCTT		765
	Ile Ala Gly His Thr Tyr Leu Gln Ala ***		
240		245	

【図面の簡単な説明】

【図1】グルタチオン-S-トランスフェラーゼ=単純ヘルペスウイルス1型プロテアーゼ融合蛋白質の発現ベクター pGSTThHP の構築工程を示す図。

【図2】HSV-1プロテアーゼ遺伝子の塩基配列を示す図。

【図3】合成基質ペプチド、その切断片のHPLCによる分析結果を示す図。

【図4】培養条件1および2による培養菌体破碎物中の組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の分析結果を示す図。

【図5】培養菌体破碎物中の可溶性画分から、組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質のグルタチオンセファロース 4B カラムによる粗精製を示す図。

【図6】グルタチオンセファロース 4B カラムによる粗精製後、組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の

セファクリル S-200 HR カラムによる精製を示す図。

【図7】培養条件1および2により生産された、精製済の組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の蛋白質量を比較する図。

【図8】培養条件1および2により生産された、精製済の組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の酵素活性を比較する図。

【図9】精製済組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質の酵素反応速度の基質濃度依存性を Lineweaver-Burk プロットする図。

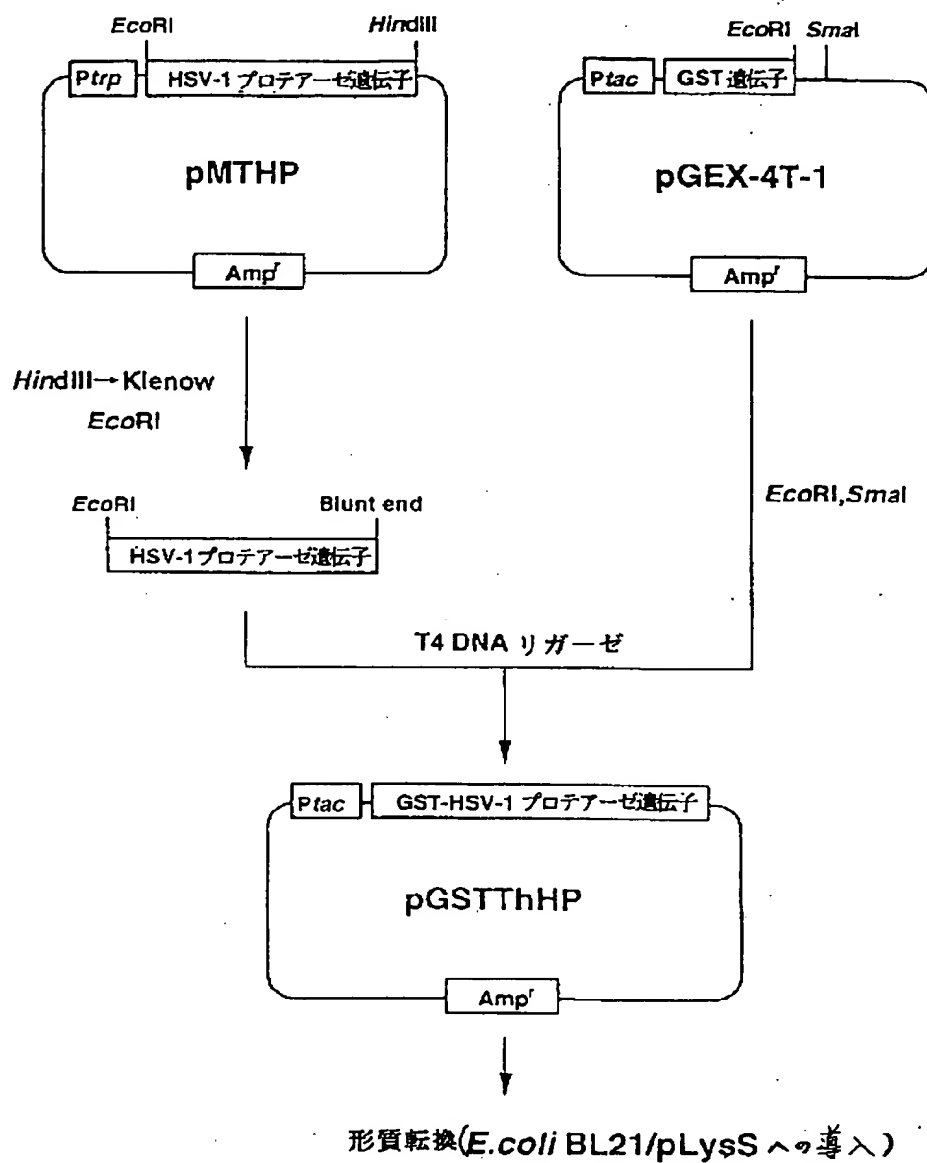
【図10】未精製の組換え基質融合蛋白質二種の分析結果を示す図。

【図11】可溶性画分からアミロースカラムにより精製された組換え基質融合蛋白質二種の分析結果を示す図。

【図12】組換え基質融合蛋白質二種の組換え型HSV-1プロテアーゼ融合蛋白質による酵素切断を示す図。

【図1】

GST-HSV-1 プロテアーゼ発現ベクターの構築



【図2】

```

      10      20      30      40      50      60
GAATTCATGCGCAGCCGATGCCCCGGGAGACCGGATGGAGGAGCCCTGCCAGACAGGGCC
MetAlaAlaAspAlaProGlyAspArgMetGluGluProLeuProAspArgAla

      70      80      90      100     110     120
GTGCCCATTACGTGGCTGGGTTTTTGGCCCTGTATGACAGCGGGGACTCGGGCGAGTTG
ValProIleTyrValAlaGlyPheLeuAlaLeuTyrAspSerGlyAspSerGlyGluLeu

      130     140     150     160     170     180
GCATTGGATCCGGATACGCTGCGTGCGGCCCTGCCTCCGGATAACCCACTCCCGATTAAAC
AlaLeuAspProAspThrValArgAlaAlaLeuProProAspAsnProLeuProIleAsn

      190     200     210     220     230     240
GTGGACCACCGCGCTGCGTGGAGGTGGGGCGGGTGCTGGCCGTGGTTCGACGACCCCGC
ValAspHisArgAlaGlyCysGluValGlyArgValLeuAlaValValAspAspProArg

      250     260     270     280     290     300
GGGCCGTTTTTTGTGGGACTGATCGCCTGCGTGCAACTGGAGCGCGTCTCTCGAGACGGCC
GlyProPhePheValGlyLeuIleAlaCysValGlnLeuGluArgValLeuGluThrAla

      310     320     330     340     350     360
GCCAGCGCTGCGATTTTTCGAGCGCCGCGGGCCCGCGCTCTCCCGGAGGAGCGCCTGTTG
AlaSerAlaAlaIlePheGluArgArgGlyProProLeuSerArgGluGluArgLeuLeu

      370     380     390     400     410     420
TACCTGATCACCAACTACCTGCCCTCGGTCTCCCTGGCCACAAAACGCCTGGGGGGCGAG
TyrLeuIleThrAsnTyrLeuProSerValSerLeuAlaThrLysArgLeuGlyGlyGlu

      430     440     450     460     470     480
GCGCACCCCGATCGCACGCTGTTCCGCGCACGTCGCGCTGTGCGCGATCGGGCGGCGCCTC
AlaHisProAspArgThrLeuPheAlaHisValAlaLeuCysAlaIleGlyArgArgLeu

      490     500     510     520     530     540
GGCACTATCGTCACCTACGACACCGGTCTCGACGCCGCCATCGCGCCCTTTCCGCCACCTG
GlyThrIleValThrTyrAspThrGlyLeuAspAlaAlaIleAlaProPheArgHisLeu

      550     560     570     580     590     600
TCGCGGCGCTCTCGCGAGGGGGCGCGGCGACTGGCCGCCGAGGCCGAGCTCGCGCTGTCC
SerProAlaSerArgGluGlyAlaArgArgLeuAlaAlaGluAlaGluLeuAlaLeuSer

      610     620     630     640     650     660
GGACGCACCTGGGCGCCCGGGCTGGAGGCGCTGACCCACACGCTGCTTCCACCGCCGTT
GlyArgThrTrpAlaProGlyValGluAlaLeuThrHisThrLeuLeuSerThrAlaVal

      670     680     690     700     710     720
AACAACATGATGCTGCGGGACCGCTGGAGCCTGGTGGCCGAGCGCGGCGGCGAGGCCGGG
AsnAsnMetMetLeuArgAspArgTrpSerLeuValAlaGluArgArgArgGlnAlaGly

      730     740     750     760
ATCGCCGGACACACCTACCTCCAGGCGTGATGAAGATCTAAGCTT
IleAlaGlyHisThrTyrLeuGlnAla***

```

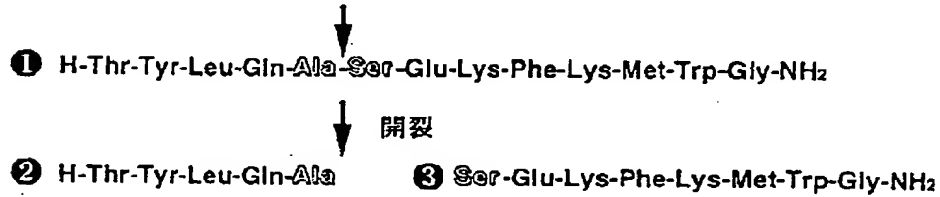
【図3】

HSV-1 プロテアーゼによる合成基質の切断

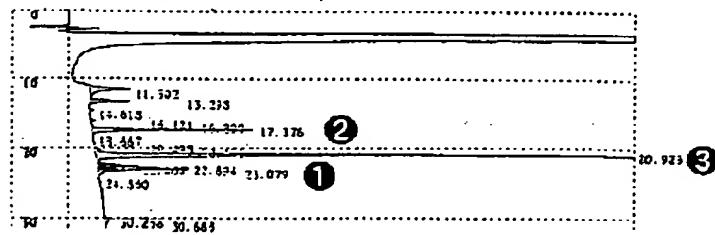
HSV-1 プロテアーゼ用の合成基質の配列

H-Thr-Tyr-Leu-Gln-Ala-Ser-Glu-Lys-Phe-Lys-Met-Trp-Gly-NH₂

HSV-1 プロテアーゼ

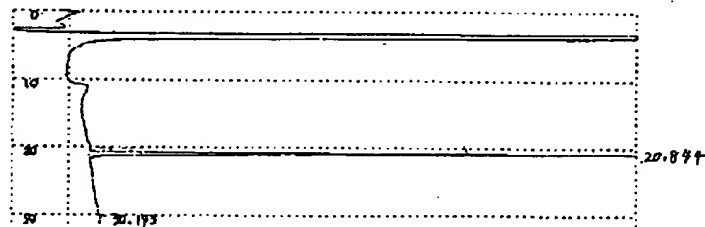


逆相 HPLC チャート



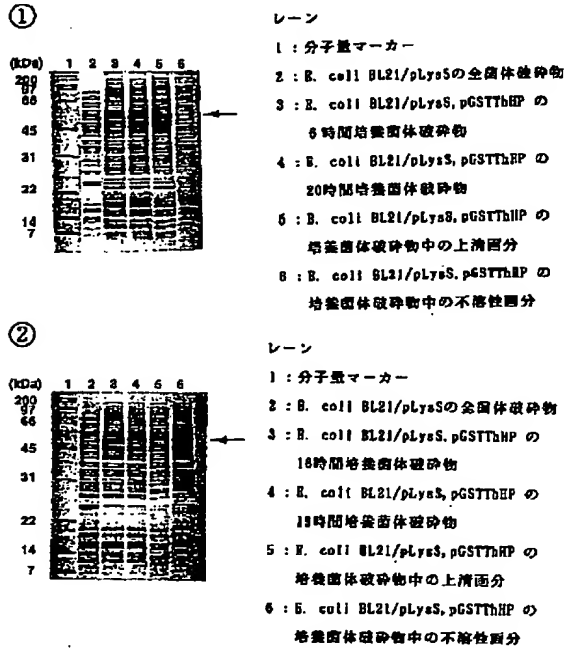
C末生成物の標品

H-Ser-Glu-Lys-Phe-Lys-Met-Trp-Gly-NH₂



【図4】

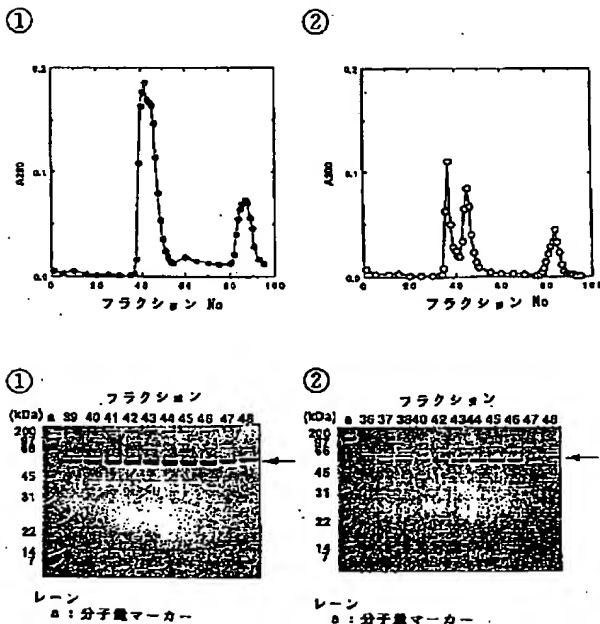
GST-HSV-1 プロテアーゼ生産菌からの GST-HSV-1 プロテアーゼの抽出



【図6】

GST-HSV-1 プロテアーゼのゲル濾過クロマトグラフィーによる精製

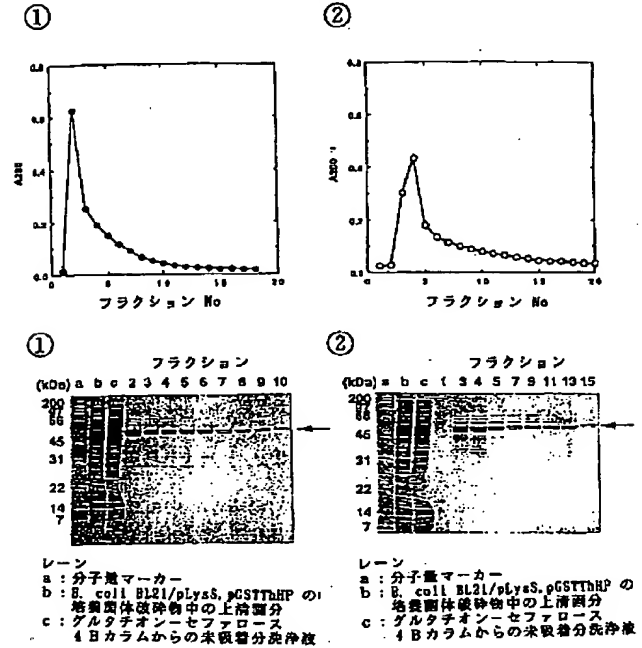
セファロキシル S-200 画カラムのクロマトグラム



【図5】

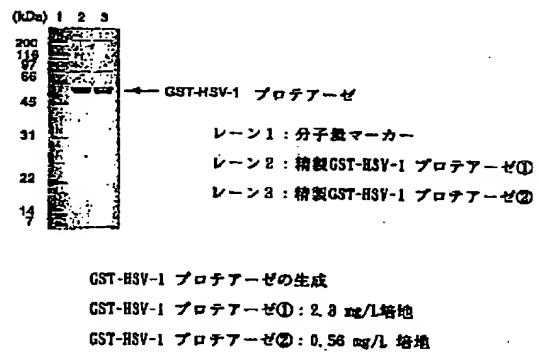
GST-HSV-1 プロテアーゼのアフィニティークロマトグラフィーによる精製

グルタチオン-セファロース 4B カラムのクロマトグラム



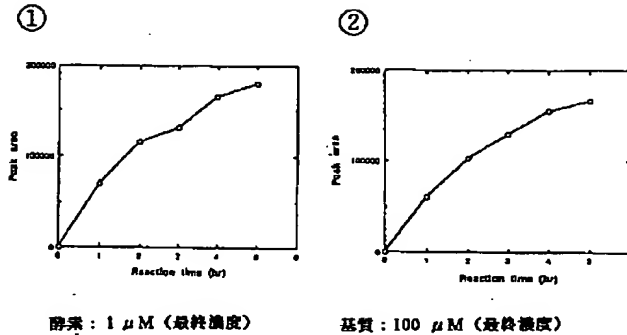
【図7】

GST-HSV-1 プロテアーゼ生産菌の培養条件の検討



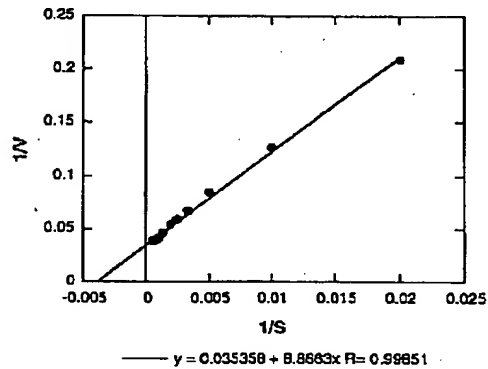
【図8】

GST-HSV-1プロテアーゼ活性の比較



【図9】

合成基質でのHSV-1プロテアーゼのLineweaver-Burkプロット

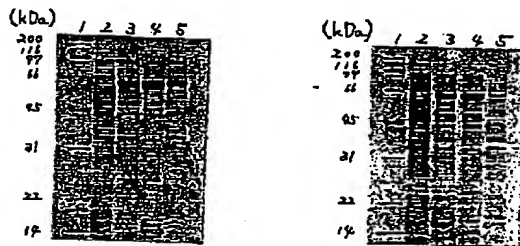


$$K_m = 251 \mu\text{M}, V_{\max} = 28.3 \text{ pmol/min}, k_{\text{cat}} = 1.13 \text{ min}^{-1}$$

【図10】

1. UL26のN末端側の切断配列 (17 a.a.) を有する組換え基質

2. UL26のC末端側の切断配列 (17 a.a.) を有する組換え基質



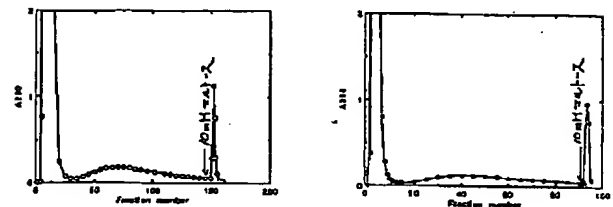
レーン1: 分子重マーカー
レーン2: 大腸菌 HB101 菌 (宿主のみ)
レーン3: 大腸菌 HB101/pMALNAX 菌 (宿主のみ)
レーン4: 大腸菌 HB101/pMALNAX 菌 (宿主のみ) + 可溶性基質
レーン5: 大腸菌 HB101/pMALNAX 菌 (宿主のみ) + 不溶性基質
レーン6: 大腸菌 HB101/pMALNAX 菌 (宿主のみ) + 可溶性基質 + 可溶性基質

【図11】

アミロースカラムのクロマトグラム

1. UL26のN末端側の切断配列 (17 a.a.) を有する組換え基質

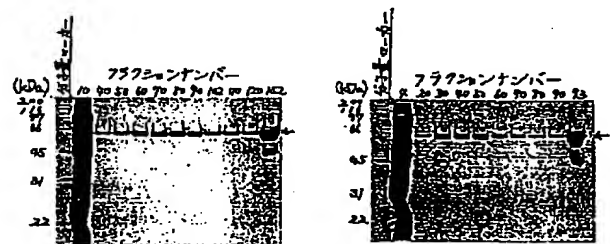
2. UL26のC末端側の切断配列 (17 a.a.) を有する組換え基質



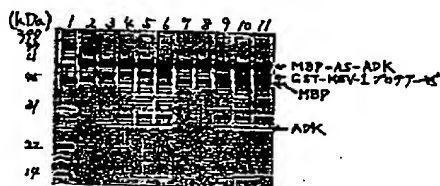
アミロースカラムから溶出された組換え基質のSDS-PAGEによる分析

1. UL26のN末端側の切断配列 (17 a.a.) を有する組換え基質

2. UL26のC末端側の切断配列 (17 a.a.) を有する組換え基質



【図12】



レーン1: 分子重マーカー
レーン2: 組換え基質のみ (インキュベーション0時間)
レーン3: 組換え基質のみ (インキュベーション1時間)
レーン4: 酵素 (1 μ g) + 組換え基質
レーン5: 酵素 (2 μ g) + 組換え基質
レーン6: 酵素 (3 μ g) + 組換え基質
レーン7: 組換え基質のみ (インキュベーション0時間)
レーン8: 組換え基質のみ (インキュベーション1時間)
レーン9: 酵素 (1 μ g) + 組換え基質
レーン10: 酵素 (2 μ g) + 組換え基質
レーン11: 酵素 (3 μ g) + 組換え基質

UL26のN末端切断配列を有する組換え基質

UL26のC末端切断配列を有する組換え基質